

Simulador gástrico distal *in vitro* para el análisis de disolución de fármacos

Fernando Donis-Rabanales¹, Itzel Martínez-Camacho², María Soledad Córdova-Aguilar³, Silvana Cortés-Lagunes⁴, Juan Carlos Durán-Álvarez⁵, Alberto Caballero-Ruiz⁶, Gabriel Ascanio⁷

¹Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: l.fer.donis@gmail.com

²Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: itzelcam1997@gmail.com

³Grupo de Ingeniería de Proceso, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: marisol.cordova@icat.unam.mx

⁴Catálisis y Procesos de Superficie, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: silvana.cortes@icat.unam.mx

⁵Catálisis y Procesos de Superficie, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: carlos.duran@icat.unam.mx

⁶Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: alberto.caballero@icat.unam.mx

⁷Grupo de Ingeniería de Proceso, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Email: gabriel.ascanio@icat.unam.mx

Resumen

Se desarrolló un simulador gástrico el cual permite llevar a cabo el análisis de desintegración química de alimentos y productos nutricionales, así como el análisis de disolución de fármacos en condiciones muy similares a las encontradas en el proceso gástrico humano en la región distal. El simulador gástrico distal *in vitro* se fabricó mediante manufactura aditiva. Consta de membranas blandas que permite simular las paredes gástricas que permiten generar el movimiento de manera cercana al comportamiento fisiológico. Con el fin de evaluar la capacidad de disolución de fármacos en el simulador gástrico se empleó prednisona, el cual es un estándar de verificación en pruebas de disolución aprobado por la farmacopea de los Estados Unidos (USP). Los resultados se compararon con uno de los dispositivos aprobados por la USP. Los resultados obtenidos permitieron llevar a cabo el análisis de disolución en condiciones mucho más reales y cercanas al proceso humano en comparación con el dispositivo propuesto por la USP.

Palabras clave: peristalsis; simulador gástrico; disolución; farmacopea EU.

Abstract

A gastric simulator was developed which allows carrying out the analysis of chemical disintegration of foods and nutritional products, as well as the analysis of drug dissolution under conditions very similar to those found in the human gastric process in the distal region. The *in vitro* distal gastric simulator was fabricated by means of additive manufacture. It consists of soft membranes that simulate the gastric walls that allow movement to be generated in a way that is close to the physiological behavior. In order to evaluate the dissolution capacity of drugs in the gastric simulator, prednisone was used, which is a verification standard in dissolution tests approved by the United States Pharmacopeia (USP). The results were compared to one of the USP approved devices. The results obtained allowed the dissolution analysis to be carried out in conditions that were much more realistic and closer to the human process compared to the device proposed by USP.

Keywords: peristalsis; gastric simulator; dissolution; US pharmacopeia.

1. Introducción

Con el fin de determinar la eficacia y seguridad de un producto farmacéutico es necesario llevar a cabo pruebas de medición de la tasa o porcentaje de disolución. La farmacopea de los Estados Unidos de América (USP por sus siglas en inglés) ha desarrollado siete aparatos estandarizados, entre los cuales se encuentra el de paletas (USP 2). Sin embargo, estos aparatos y métodos presentan algunos inconvenientes, como la posición de la zona de muestreo, la ubicación del fármaco en el recipiente y las condiciones ambientales, entre otras. Por otro lado, la disolución de productos farmacéuticos empleando dichos aparatos se lleva a cabo en tanques con agitación continua, lo cual dista mucho del mezclado gástrico que se produce en el cuerpo humano. Por tal motivo, se desarrolló un modelo gástrico *in vitro* que permite, entre otros experimentos, llevar a cabo pruebas de disolución de fármacos en condiciones muy similares al proceso de digestión gástrica [1].

El simulador gástrico distal *in vitro* consta de un par de cámaras que simulan la región distal del estómago humano que comprende la región anatómica del antro y del píloro, la cuales se fabricaron en resina de poliuretano transparente, en el interior de cada cámara se colocó una membrana flexible de silicón con apariencia traslúcida fabricada con Ecoflex® 00-30, esta característica permite visualizar el proceso de mezclado gástrico. El movimiento peristáltico se logra por medio de la presurización alterna de las membranas blandas, lo cual se logra gracias al suministro de agua a 37 °C al interior de las cámaras mediante un par de cámaras que transforman la presión neumática en presión hidráulica. Esto permite replicar el flujo peristáltico con el objetivo de reproducir las fases de propulsión y retropulsión presentes en el proceso de digestión gástrica en la región distal. Con el fin de registrar los valores de amplitud y presión, así como la onda de presión de la actividad contráctil se empleó un catéter de manometría esofágico [2,3].

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de disolución de fármacos en un simulador gástrico utilizando un estándar de verificación aprobado por la USP, y comparar los resultados con uno de los dispositivos aprobados por dicho organismo, el cual opera en condiciones mecánicas muy distintas al comportamiento humano.

2. Materiales y métodos

2.1. Dispositivos

El simulador gástrico distal *in vitro* (IV-DGS) (Figura 1), es un modelo fabricado mediante manufactura

aditiva que simula la región distal del estómago humano, y está conformado por dos cámaras huecas fabricadas por el proceso de colada al vacío de resina de poliuretano [1]. Al interior de cada cámara se colocó una membrana blanda fabricada con caucho de silicona Ecoflex® 00-30 (Smooth-On, Easton, PA) para simular las paredes gástricas. Al exterior de las membranas se circuló agua a 37 ± 0.5 °C. En cada cavidad se acopló una cámara hidroneumática (Figura 1a) para transformar la presión neumática en presión hidráulica para realizar la presurización alterna y con ello replicar las ondas de contracción gástrica y emular los flujos gástricos de propulsión y retropulsión que se presentan durante la digestión fisiológica. Por medio de un sistema de control, se ajusta la amplitud de presión de estos flujos para trabajar dentro de los rangos fisiológicos, entre 20 - 30 mm Hg [4,5]. Mediante un catéter de manometría esofágica se midió la presión al interior de las membranas blandas. Finalmente, se ajustó la frecuencia de contracción para realizar 3 contracciones por minuto.

Por otro lado, se fabricó uno de los dispositivos de pruebas de disolución con las medidas especificadas por la Farmacopea de los Estados Unidos, apartado 711 [USP, 711], el cual consta de un recipiente cilíndrico de vidrio con fondo semiesférico, y una capacidad nominal de 1 L (200 mm de altura y 100 mm de diámetro interno). El modelo contó con una chaqueta para mantener la temperatura en el interior del vaso a 37 ± 0.5 °C. El elemento de agitación se compuso de un aspa y un eje fabricado en acero inoxidable 316L, con las medidas establecidas en el apartado 711, el cual fue accionado por un motor acoplado en la parte superior (Figura 2). El sistema se montó sobre una mesa óptica aislada de vibraciones mediante suspensión neumática.

Además, se llevó a cabo la calibración mecánica del dispositivo USP 2, como lo indica el manual de procedimiento para la calibración Mecánica y Prueba de Verificación de Desempeño para los Aparatos 1 y 2, el cual incluye la evaluación de la instalación del aparato, su operación y desempeño, utilizando diferentes instrumentos de medición para verificar el cumplimiento de los requisitos de los componentes, como la paleta y vaso. Durante de calibración se evaluaron los siguientes aspectos: nivelación de la mesa de trabajo y base del aparato, dimensiones de paleta y vaso, alineaciones del eje, vaso y centrado, oscilación del eje, velocidad de rotación y temperatura, todos los parámetros medidos fueron comparados con los criterios de aceptación establecidos por la USP para garantizar el correcto funcionamiento y desempeño del aparato de disolución.

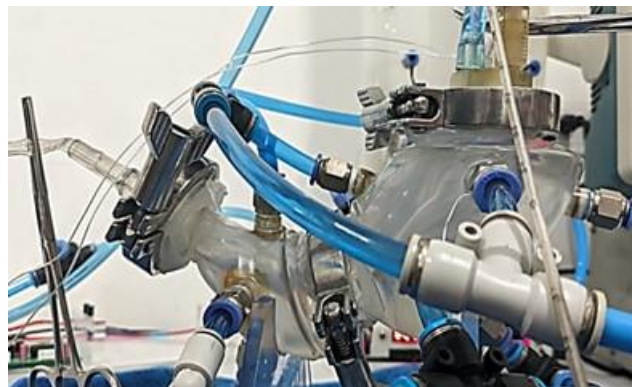
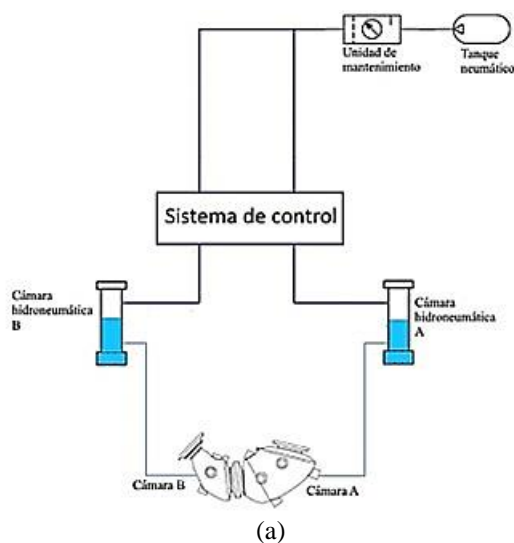


Figura 1.: (a) Montaje experimental; (b) Simulador gástrico distal IV-DGS.

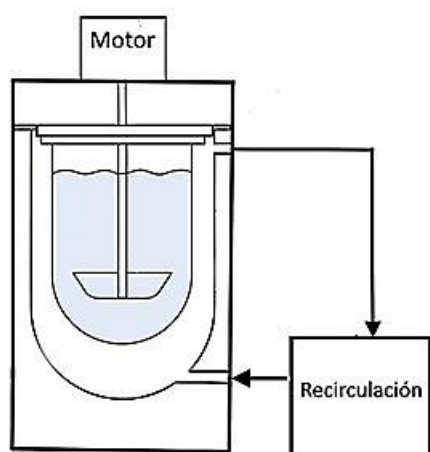


Figura 2. Dispositivo aprobado por la USP (USP 2).

2.2. Condiciones de operación

La definición de los parámetros del simulador IV-DGS se establecieron de acuerdo con los parámetros de digestión de una persona sana en estado de alimentación. Para ello, se ajustó la amplitud de presión en un rango entre 16 y 25 mm Hg, la frecuencia de contracciones fue de 3 contracciones por minuto, y la temperatura de 37 °C. En casa ensayo se usaron 150.0 mL de agua desgasificada por ebullición, como medio de disolución. El estándar de disolución, una tableta de prednisona de 5 mg se dosificó en la parte superior del modelo, y la duración del experimento fue de 30 minutos.

Al finalizar la prueba se extrajeron 20 mL del medio del medio de disolución en la parte inferior del simulador, los cuales se desecharon, e inmediatamente se tomó una alícuota de 30 mL. La muestra se pasó a través de un filtro de jeringa (tipo PVDF de 0.45 μm), desechando los primeros 5 mL de filtrado y el resto se transfirieron a un tubo de ensayo para su posterior análisis.

En lo que respecta a las condiciones del dispositivo USP 2, se mantuvo una velocidad de agitación constante de 50 rpm \pm 1 rpm, en donde el elemento de agitación entre la parte inferior de la superficie interna del recipiente y la parte inferior del elemento de

agitación se mantuvo a una distancia de 25 ± 2 mm. La temperatura se mantuvo en $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ usando 500.0 mL de agua destilada y desgasificada. La tableta de prednisona se suministró por la parte superior en el centro del recipiente. La prueba inició cuando la tableta tocó el fondo del recipiente. El tiempo de duración de cada experimento fue de 30 minutos. Vale la pena mencionar que la USP recomienda realizar estas pruebas por sextuplicado de manera simultánea. Sin embargo, en el presente trabajo solo se realizó una prueba con fines de comparación.

2.3. Análisis de las muestras

La concentración de prednisona en las muestras se determinó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS, por sus siglas en inglés). Para ello, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (Infinity 1200 Agilent Technologies), equipado con una columna Zorbax Eclipse SB C18 (150 mm \times 4,6 mm y 5 μm de espesor de fase estacionaria). La fase móvil fue una mezcla 60:40 compuesta por acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % (v/v). El flujo de la fase móvil se mantuvo en 0,6 mL/min en modo isocrático durante los 6.0 minutos del análisis. El volumen de inyección fue de 5 μL . La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Agilent Technologies 6400, modelo 6420), con ionización de electrospray en modo positivo (ESI+), utilizando N_2 como gas de secado (300 $^{\circ}\text{C}$ y con un flujo de 12 L/min). El voltaje del capilar se fijó en 4000 V y la presión del nebulizador fue de 15 psi. La identificación de prednisona se realizó en el modo de adquisición MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple), tomando el ión $m/z = 359.2$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ como precursor, en tanto que los iones $m/z = 341.3$ y $m/z = 313.4$ fueron los iones producto. El voltaje de fragmentación se fijó en 110 V, mientras que la energía de colisión fue de 3 eV, y el voltaje de la celda de aceleración fue de 5.

La validación del método analítico se realizó conforme a los criterios de aceptación recomendados por los capítulos 1225 y 1092 de la USP, titulados "Validación de Procedimiento Farmacopéicos" y "Procedimiento de disolución: Desarrollo y validación", respectivamente.

Al finalizar la prueba de disolución de prednisona en el dispositivo 2 de la USP se espera una concentración de 20 mg/L y 66.66 mg/L para el modelo IV-DGS.

Para la cuantificación, se utilizó una curva de calibración en el intervalo de concentración de 1.0 a 20.0 mg/L. Para la determinación de prednisona en las muestras provenientes del aparato USP 2, se preparó

una dilución 1:2 de la muestra, en tanto que para las muestras provenientes del sistema IV-DGS se preparó una dilución 1:5, buscando que las muestras se encuentren dentro del intervalo lineal del método analítico.

Tras obtener el área bajo la curva, mediante regresión lineal se determinó la concentración de prednisona disuelta, así como el porcentaje de disolución, la media geométrica y la desviación estándar relativa de los seis experimentos de cada modelo.

3. Resultados

3.1. Validación del método HPLC-MS/MS

Para determinar el intervalo lineal y el intervalo de trabajo se midieron, por triplicado, 13 niveles de concentración de una solución estándar de prednisona en agua desgasificada. La medición se realizó en un rango de concentración de 0.10 a 20.0 mg/L. Se graficó el área bajo la curva en función de la concentración, y al realizar la inspección visual del gráfico se determinó como intervalo de trabajo al comprendido entre 1.0 y 20 mg/L (Figura 3), pues en este rango se observó un comportamiento lineal. En la Figura 4 se muestra el gráfico de residuales para el intervalo de trabajo, los datos se distribuyeron entre valores negativos y positivos de manera aleatoria, indicando que el modelo lineal es el adecuado para describir la tendencia de los datos en el intervalo de trabajo.

Adicionalmente, se obtuvo el valor de la pendiente y la ordenada al origen de la función lineal, así como el error asociado (considerando el estadístico *t-Student* al 95 % de confianza con $n - 2$ grados de libertad, Ecuación 1), y el coeficiente de correlación. Este último se determinó como 0.9971, lo que cumple con el criterio de aceptación de la USP ($r^2 \geq 0.98$).

$$\text{Área (uA)} = 11450.75 \pm 48.63 \left(\frac{\text{uA}\cdot\text{L}}{\text{mg}} \right) C \cdot \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) + 14198.29^\circ\text{F} \pm 579.30 \text{ (uA)} \quad (1)$$

Además, se verificó que la ordenada al origen fuera estadísticamente diferente de cero, mediante una prueba *t-Student* (Ecuación 2) a una cola, donde n es el número de puntos de la curva de calibración, \bar{x} es el valor de la ordenada al origen y s es la desviación estándar, al 95 % de confianza con $n - 2$ grados de libertad. La hipótesis nula fue rechazada, toda vez que $t_0 = 50.49 > t_c = 1.71$.

$$t_0 = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s} \quad (2)$$

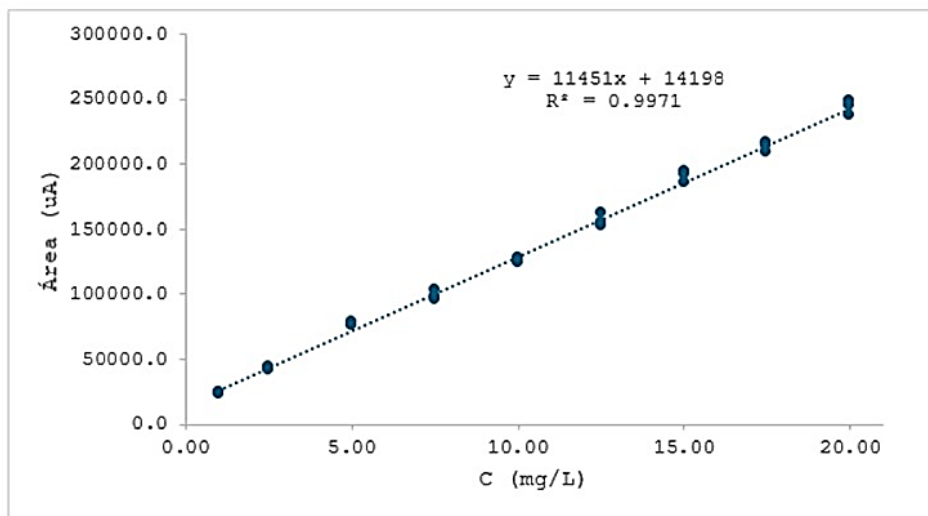


Figura 3. Área en función de la concentración de prednisona en el intervalo de concentraciones de 1.0 a 20.0 mg/L.

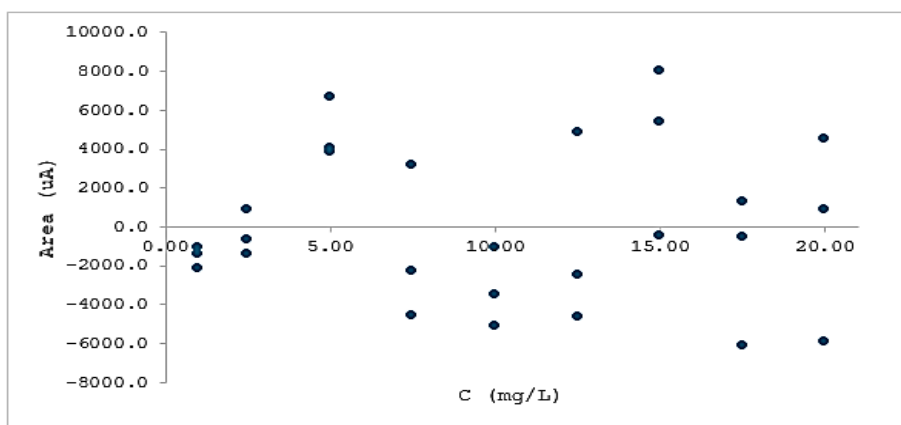


Figura 4. Gráfica de residuales del intervalo de trabajo para el intervalo de concentraciones de 1 a 20.0 mg/L.

La precisión del método analítico se evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio en días diferentes de análisis. Se midieron por triplicado y de manera independiente tres niveles del intervalo de trabajo (inferior, medio y superior), determinando el porcentaje de recuperación para cada medición, así como su desviación estándar relativa (DER) para ambos días individualmente (repetibilidad) y considerando las 18 mediciones (reproducibilidad). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

El apartado 1092 de la USP establece como criterio de aceptación que la DER debe ser menor al 2 %, criterio que se cumple para todos los casos. Por otro lado, el porcentaje de recuperación debe estar dentro del intervalo de 80 a 110 %, requisito que también cumplen los datos presentados. Con base en los resultados presentados se concluye que el método

analítico es preciso en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Siguiendo lo establecido por la USP, con el fin de determinar la exactitud del método se graficó la concentración real de prednisona en función de la concentración esperada a lo largo de todo el intervalo de trabajo (Figura 5). Mediante regresión lineal se obtuvo el valor de la pendiente y su intervalo de confianza, el cual debe incluir el valor de la unidad para establecer que el método es exacto. El intervalo de trabajo para la pendiente de la Figura 5 se obtuvo considerando el error asociado, con una *t-Student* al 95 % de confianza y con *n*-2 grados de libertad. El resultado obtenido fue 1.000 ± 0.004 , lo que cumple con lo establecido en la guía 1225, por lo que el método analítico es exacto en el intervalo de 1.0 a 20.0 mg/L.

Tabla 1. Resultados de precisión y repetibilidad del método HPLC–MS/MS

Analista	Día	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	Recobro (%)	Promedio por día (%)	s	DER (%)	
1	1	1.00	1.00	99.5	99.4	0.6470	0.7	1.1
			0.99	98.7				
			0.99	99.1				
		10.00	9.89	98.8				
			9.88	98.7				
			9.91	99.0				
		20.01	20.02	100.0				
			20.10	100.5				
			20.00	99.9				
	2	1.00	0.99	98.5	99.2	1.5034	1.5	
			0.97	97.4				
			0.98	98.3				
		10.00	9.91	99.1				
			9.80	98.0				
			9.86	98.5				
		20.01	20.40	102.0				
			20.17	100.8				
			20.08	100.4				

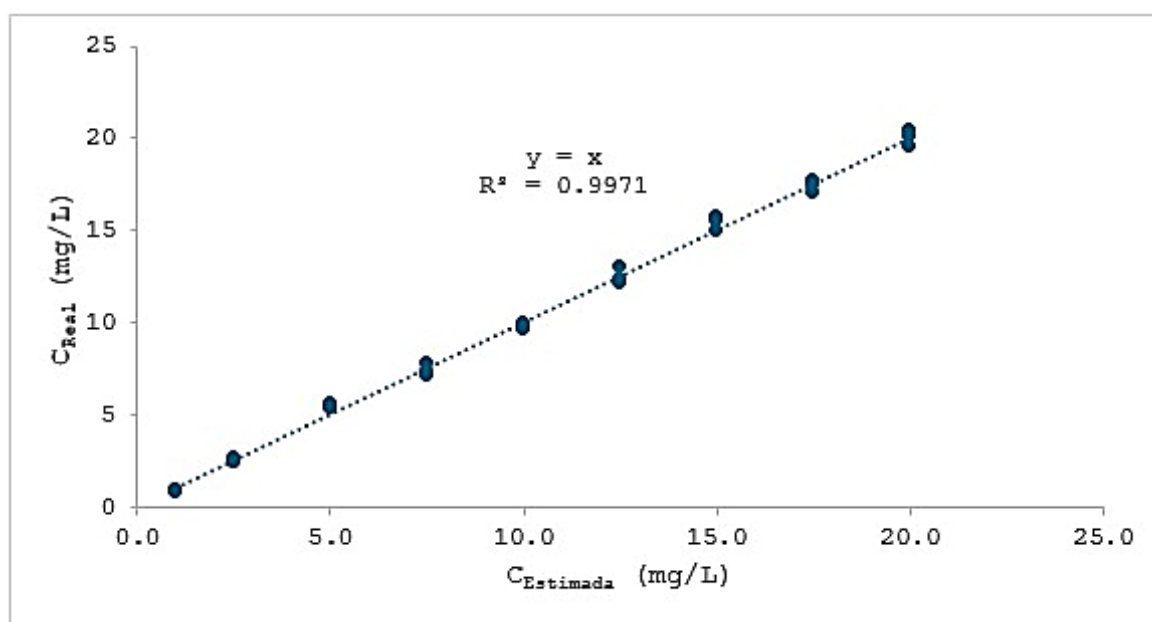


Figura 5. Gráfica de la curva de calibración por triplicado para el intervalo de concentraciones de 1 a 20.0 mg/L.

La especificidad, definida como la capacidad del método analítico para evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de los componentes de la matriz, se determinó mediante la comparación del cromatograma del medio de disolución (Figura 6) vis-a-vis un cromatograma obtenido de una muestra

tomada del dispositivo USP 2, con una concentración aproximada de 1.0 mg/L de prednisona (Figura 7). La selectividad que proporciona el espectrómetro de masas permitió identificar al analito de manera inequívoca en el medio de disolución.

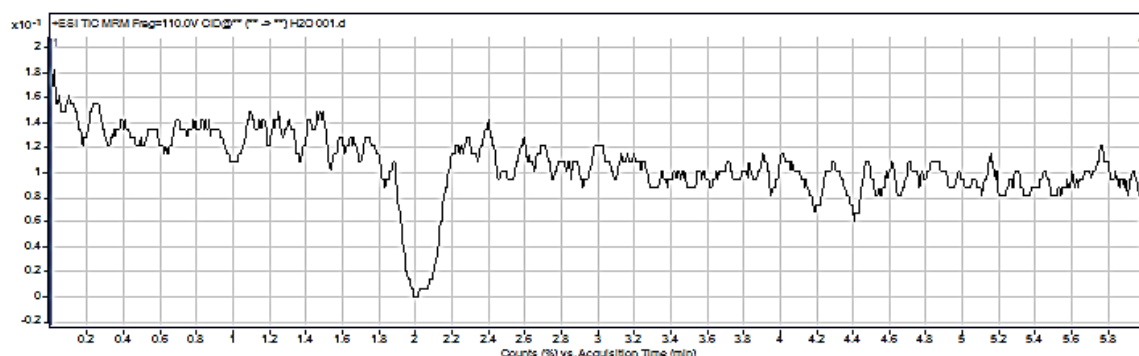


Figura 6. Cromatograma del medio sin prednisona

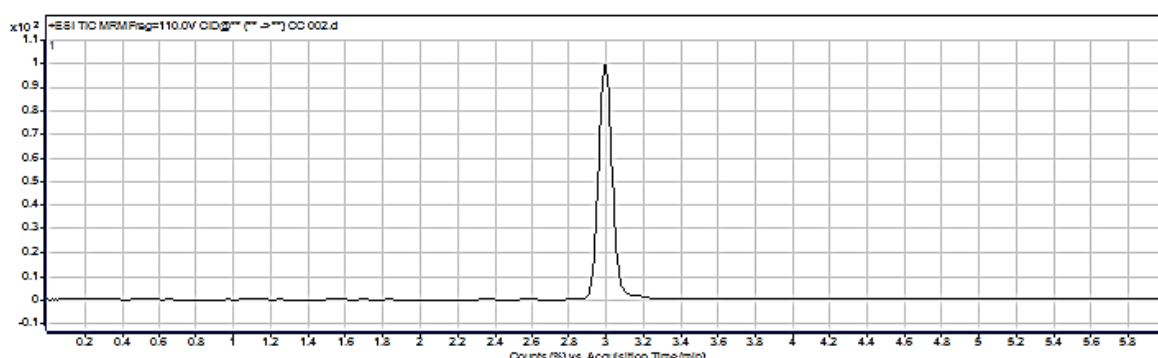


Figura 7. Cromatograma de una muestra tomada del dispositivo USP 2 de a 1.0 mg/L de prednisona.

3.2. Disolución con el dispositivo USP 2

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de masa disuelta para cada tableta de prednisona ER (USP: 1222818, lote F161Y0), empleando el equipo USP 2. El 54.8 % de la masa del fármaco fue disuelto, con una DER de 2.4 %. El certificado de calibración de las tabletas establece

Tabla 2. Resultados de prueba de verificación de rendimiento de la disolución para el aparato 2 de la

que, el porcentaje promedio de prednisona disuelta debe estar dentro del intervalo de 46 – 59 %, con una DER del 6.2 %, para la prueba de una sola etapa, la cual consiste en seis experimentos. Con los resultados obtenidos se cumple con los criterios de aceptación y en consecuencia con la prueba PVT para el equipo USP 2.

USP, con tabletas calibradoras de 10 mg de prednisona ER.

Prueba PVT	Masa (g)	Prednisona disuelta en medio (%)	Media geométrica prednisona disuelta (%)	Masa promedio (g)	Masa disuelta	
					S (g)	DER (%)
1	5.65	56.4	54.8	5.48	0.13	2.4
2	5.38	53.8				
3	5.48	54.8				
4	5.64	56.4				
5	5.38	53.8				
6	5.36	53.6				

3.3. Disolución con el simulador IV-DGS

De manera análoga a la validación del aparato USP 2 se llevaron a cabo las pruebas de disolución en el

equipo IV-DGS. En la Tabla 3 se muestran los resultados de los seis experimentos realizados con las tabletas de prednisona ER (USP: 1222818, lote F161Y0), en las cuales se obtuvo un porcentaje

disolución promedio de 57.8 %, con un una DER de 5.5 %. Con ello se cumple el criterio de aceptación especificado en el certificado del estándar.

El modelo IV-DGS obtuvo resultados comparables a los obtenidos con el equipo USP 2, a pesar de que el modelo IV-DGS no cuenta una metodología estandarizada. No obstante, este comportamiento

podría indicar la importancia de los flujos gástricos de propulsión y retropulsión tanto en la disolución como en la desintegración de los alimentos, lo que sugiere que el modelo IV-DGS podría ser una herramienta alternativa viable para realizar estudios de digestión simulada.

Tabla 3 Resultados de prueba de verificación de rendimiento de la disolución para el simulador IV-DGS de la USP, con tabletas calibradoras de 10 mg de prednisona ER.

Prueba PVT	Masa (g)	Prednisona disuelta en medio (%)	Media geométrica prednisona disuelta (%)	Masa promedio (g)	Masa disuelta	
					S (g)	DER (%)
1	5.62	56.2	57.8	5.8	0.31	5.5
2	5.40	54.0				
3	5.78	57.8				
4	5.54	55.4				
5	6.13	61.3				
6	6.18	61.8				

Conclusiones

Se llevó a cabo el análisis de disolución de fármacos en un simulador gástrico distal in vitro. Para ello, se utilizó prednisona como estándar de verificación y los resultados obtenidos fueron comparados con uno de los dispositivos aprobados por la Farmacopea de los Estados Unidos. Los resultados con el simulador gástrico arrojaron una desviación estándar y una desviación estándar relativa mayores comparados con los obtenidos con el dispositivo de la USP; sin embargo, las condiciones de operación empleadas en el simulador son más reales y cercanas a las de un estómago humano. Los dispositivos empleados por la USP generan flujo de agitación, lo que dista mucho del mezclado gástrico en el ser humano. El simulador gástrico empleado en este trabajo podría ser considerado en el futuro como una nueva alternativa para el análisis de disolución de medicamentos en el estómago.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la DGAPA-UNAM por el financiamiento proporcionado a través del proyecto IN-119423. También se agradece a los Mtro. Sergio Padilla y Gerardo Ruiz por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Metrología del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM.

Referencias

- [1] F. Donis-Rabanales, T. López-Ruiz, L. Ruiz-Huerta, G. Ascanio, E. Brito-de la Fuente, A. Caballero-Ruiz. Development of an In Vitro Distal

Gastric Simulator to mimic the mechanical action of the human stomach, Food Research International, 161, article 111902, 2022.

- [2] F. Donis-Rabanales, I.G. Martínez-Camacho, A. Caballero-Ruiz, M.S. Córdova-Aguilar, E. Brito-de la Fuente, G. Ascanio. In Vitro Gastric System Simulator. 11th World Congress of Chemical Engineering, Buenos Aires, Argentina, 4-8 junio 2023.
- [3] F. Donis-Rabanales, J. Montalvo-González, T. López-Ruiz, L. Ruiz-Huerta, A. Caballero-Ruiz. Protocolos de digestibilidad para modelos gástricos in vitro. 43 Congreso de la Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica.
- [4] S. Maqbool, H.P. Parkman & F.K. Friedenberg. Wireless Capsule Motility: Comparison of the SmartPill® GI Monitoring System with Scintigraphy for Measuring Whole Gut Transit. Digestive Diseases and Sciences, 54(10), 2167–2174, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0899-9>.
- [5] S. Bellmann, J., Lelieveld, T. Gorissen, M. Minekus M. and R., Havenaar. Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology, Food Research International, Vol. 88, Part B, 191-198, 2016.